

Über die Autolyse der Thymus.

Von

Dr. M. Kashiwabara aus Takamatsu in Japan.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 16. April 1913.)

In einer Reihe von Untersuchungen aus dem genannten Laboratorium sowie von anderer Seite ist festgestellt worden, daß bei der antiseptischen Autolyse der Leber Monoaminosäuren, Albumosen in geringer Menge und Purinbasen auftreten, die Summe dieser Körper aber natürlich nicht aller nicht koagulierbaren Stickstoffsubstanz entspricht, vielmehr ein Teil derselben durch Diaminosäuren, Pepton und Ammoniak repräsentiert wird. Der Anteil dieser ist bisher nur auf rechnerischem Wege festgestellt worden, indem die Summe des N der Monoaminosäuren, der Albumosen und der Purinbasen von dem N der unkoagulierbaren N-Substanz in Abzug gebracht ist. Diese Aufteilung des N gibt natürlich nur eine allgemeine Vorstellung und berücksichtigt namentlich die in der Leber präformiert enthaltenen wasserlöslichen N-haltigen Extraktivstoffe nicht, welche der Hauptsache nach jedenfalls in der Monoaminosäurefraktion erscheinen dürften, kann aber immerhin bei Versuchen über den Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Autolyse, sowie über den Einfluß verschiedener Antiseptica an Stelle von Chloroform usw. als Maßstab benutzt werden.

Vor einer Reihe von Jahren ist nun Kutscher¹⁾ bei der Autolyse der Thymus, indem er einen ganz anderen Weg zur Feststellung der Produkte, als er hier verfolgt wird, einschlug, zu einem durchaus abweichenden Resultat gekommen.

Kutscher²⁾ spricht sich hierüber folgendermaßen aus:

«Die Selbstverdauung der Thymus hatte demnach das überraschende Resultat ergeben, daß von den hydrolytischen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 34, S. 114.

²⁾ l. c., S. 117.

Spaltungsprodukten der Eiweißkörper eigentlich nur zwei auftreten, nämlich Ammoniak und Lysin. Ob sich auch Histidin und Leucin bilden, muß ich noch zweifelhaft lassen, dagegen glaube ich mit Bestimmtheit sagen zu können, daß Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin vollständig fehlen.»

Kutscher erwägt dann eine Reihe von Möglichkeiten, die diesen auffallenden Befund erklären könnten — es kann in dieser Beziehung auf das Original verwiesen werden — und stellt eine Entscheidung über diese Möglichkeiten durch weitere Versuche in Aussicht.

Es schien nun von Interesse, die hier übliche Verarbeitung der Autolyseflüssigkeit auf die Thymus anzuwenden, um zu sehen, ob sich hierbei wesentliche Unterschiede von der Autolyse der Leber im Sinne Kutschers ergeben. Auch die Versuche von Kutscher nach dem von ihm eingeschlagenen Verfahren hielten wir uns für berechtigt, zu wiederholen, da seit der Mitteilung desselben mehr als 11 Jahre vergangen sind, ohne daß Kutscher auf den Gegenstand zurückgekommen ist. Auf Veranlassung von Prof. E. Salkowski und unter seiner Leitung habe ich die Bearbeitung dieses Themas unternommen; über die Resultate soll im folgenden berichtet werden.

Autolyse mit Chloroformwasser.

Es wurden zwei Mischungen angesetzt: A bestand aus 100 g Thymus und 1 l gesättigtem Chloroformwasser in einer 1½ l fassenden weithalsigen Glasstöpselflasche.

Zur Herstellung der Mischung B wurden 100 g Thymus mit Wasser zum Sieden erhitzt, erkalten gelassen, in eine ebensolche Glasstöpselflasche gebracht, das Volumen mit destilliertem Wasser gleichgemacht, dann mit 5 ccm Chloroform geschüttelt. Beide Mischungen kamen gleichzeitig in den Thermostaten. Die Digestion dauerte 70 Stunden bei 39—40°.

Die Art der Verarbeitung war genau so, wie öfters beschrieben, nur wurde diesmal auch das Ammoniak nach Krüger-Reich-Schittenhelm¹⁾ bestimmt.

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 39, S. 73.

Tabelle I.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	A		B	
	mit frischer Thymus N in g	% des N	mit gekochter Thymus N in g	% des N
1. Gesamt-N	6,72	—	2,8	—
2. Monoaminosäure-N	2,24	33,33	0,56	20,0
3. Albumosen-N	0,538	8,0	0,336	12,0
4. Purinbasen-N	1,68	25,0	0	0
4. Diaminosäure- + Pepton-N	1,718	25,56	1,802	64,35
6. NH ₃ -N	0,544	8,0	0,102	3,64

Tabelle II.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	A		B	
	mit frischer Thymus N in g	% des N	mit gekochter Thymus N in g	% des N
1. Gesamt-N	5,824	—	2,744	—
2. Monoaminosäure-N	1,904	32,68	0,784	28,57
3. Albumosen-N	0,470	8,07	0,314	11,31
4. Purinbasen-N	1,478	25,36	0	0
5. Diaminosäure- + Pepton-N	1,495	25,67	1,544	56,26
6. NH ₃ -N	0,476	8,58	0,102	3,71

Tabelle III.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	A		B	
	mit frischer Thymus N in g	% des N	mit gekochter Thymus N in g	% des N
1. Gesamt-N	6,664	—	2,688	—
2. Monoaminosäure-N	2,016	30,25	0,784	29,16
3. Albumosen-N	0,515	7,72	0,336	12,5
4. Purinbasen-N	1,501	22,52	0	0
5. Diaminosäure- + Pepton-N	2,088	31,33	1,568	58,28
6. NH ₃ -N	0,544	8,17	0,136	5,06

Tabelle IV. — 1. Gesamt-N.

Nr. des Versuches	A	B
	mit frischer Thymus N in g	mit gekochter Thymus N in g
I	6,72	2,8
II	5,824	2,744
III	6,664	2,688

Tabelle V. — 2. Monoaminosäure-N.

Nr. des Versuches	A mit frischer Thymus N in g	B mit gekochter Thymus N in g
I	2,24	0,56
II	1,904	0,784
III	2,016	0,784

Tabelle VI. — 3. Albumosen-N.

Nr. des Versuches	A mit frischer Thymus N in g	B mit gekochter Thymus N in g
I	0,538	0,336
II	0,470	0,314
III	0,515	0,336

Tabelle VII. — 4. Purinbasen-N.

Nr. des Versuches	A mit frischer Thymus N in g	B mit gekochter Thymus N in g
I	1,68	0
II	1,478	0
III	1,501	0

Tabelle VIII. — 5. Diaminosäure- + Pepton-N.

Nr. des Versuches	A mit frischer Thymus N in g	B mit gekochter Thymus N in g
I	1,718	1,802
II	1,495	1,544
III	2,088	1,568

Tabelle IX. — 6. NH₃-N.

Nr. des Versuches	A mit frischer Thymus N in g	B mit gekochter Thymus N in g
I	0,544	0,102
II	0,476	0,102
III	0,544	0,136

Tabelle X. — Mittelzahl von 3 Versuchen.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	A mit frischer Thymus		B mit gekochter Thymus		A minus B	
	N in g	% des N	N in g	% des N	N in g	% des N
1. Gesamt-N	6,402	—	2,744	—	3,658	—
2. Monoaminosäure-N.	2,054	32,01	0,709	25,91	1,345	36,77
3. Albumosen-N	0,508	7,59	0,328	11,93	0,1796	4,91
4. Purinbasen-N	1,554	24,29	0	0	1,553	42,45
5. Diaminosäure- + Pepton-N	1,767	27,52	1,638	59,63	0,129	3,52
6. NH ₃ -N	0,521	8,25	0,113	4,13	0,408	11,15

Zum Vergleich seien hier die Zahlen angeführt, die Yoshimoto¹⁾ im Mittel aus 5 Versuchen bei der Leberautolyse erhalten hat und mit den obigen zusammengestellt. Dabei ist für die Thymus der NH₃-N zu dem Diaminosäuren- usw. -N hinzuaddiert worden, da bei der Leber NH₃-N nicht bestimmt ist.

Tabelle XI.

	g		% des N	
	Leber	Thymus	Leber	Thymus
Gesamt-N	6,756	6,402	—	—
Monoaminosäure-N	4,122	2,054	60,88	32,01
Albumosen-N	0,914	0,508	13,48	7,59
Purinbasen-N	0,489	1,554	7,23	24,29
Diaminosäure- + Pepton-N	1,24	2,288	18,41	35,77

Während die Quantität des in Lösung gegangenen Gesamt-N ziemlich gleich ist, sind die Unterschiede in der Verteilung des N, wie man sieht, sehr erheblich:

1. die Monoaminosäuren betragen bei der Leber fast doppelt soviel, wie bei der Thymus,
2. ebenso verhalten sich die Albumosen,
3. dagegen beträgt der Purinbasen-N noch nicht ein Drittel von dem der Thymus, entsprechend dem bekannten großen Gehalt der Thymus an Nucleoproteiden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 58, S. 347.

4. Ebenso ist der Gehalt der Diaminosäuren nur etwa halb so hoch, wie bei der Thymus.

Ein Vergleich des $\text{NH}_3\text{-N}$ ist nicht möglich, da hierfür bei Yoshimoto keine Zahlen vorliegen und ebensowenig in anderen Versuchen von Leberautolyse.

Es wurden daher zunächst noch einige Versuche hierüber angestellt, bei denen, da es sich nur um Gesamt-N und $\text{NH}_3\text{-N}$ handelte, die Anwendung von 30 g Leber genügend erschien.

Tabelle XII.

Gesamt-N und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Bestimmung in der Leber.

Nr. des Versuches	Kalbsleber in g	Chloroformwasser ccm	Gesamt-N auf 1000 g Leber umgerechnet		$\text{NH}_3\text{-N}$ auf 1000 g Leber umgerechnet	
			A	B	A	B
			mit frischer Leber	mit gekochter Leber	mit frischer Leber	mit gekochter Leber
I	30	300	7,910	3,485	0,821	0,181
II	30	300	7,261	3,325	0,907	0,183
III	30	300	6,272	3,176	0,725	0,181

Tabelle XIII. — Mittelzahl von 3 Versuchen.

Auf 1 kg umgerechnet	A mit frischer Leber		B mit gekochter Leber	
	N in g	% des N	N in g	% des N
Gesamt-N	7,148	—	3,329	—
$\text{NH}_3\text{-N}$	0,8379	11,72	0,182	5,53

Nach diesen kurzdauernden Digestionsversuchen ergibt sich für das Ammoniak weder absolut, noch relativ zu dem in Lösung gegangenen Gesamt-N für die Thymus mehr $\text{NH}_3\text{-N}$ als für die Leber. Es fragte sich, ob solche Unterschiede vielleicht hervortreten, wenn man die Autolyse sehr lange fortsetzt.

Allgemeine Versuchsordnung.

A. 100 g fein gehackte Kalbsthymus mit gesättigtem Chloroformwasser.

B. 100 g fein gehackte Kalbsleber mit gesättigtem Chloroformwasser.

Digestionszeit im Thermostaten 21 Tage. Das weitere Verfahren ist genau so wie im vorigen Versuch.

Tabelle XIV.

Auf 1 kg Organ umgerechnet	A mit Thymus		B mit Leber	
	N in g	% des N	N in g	% des N
1. Gesamt-N	8,232	—	7,392	—
2. Monoaminosäure-N	3,36	40,81	4,48	60,61
3. Albumosen-N	0,090	1,08	0,157	2,12
4. Purinbasen-N	1,893	22,99	0,325	4,53
5. Diaminosäure- + Pepton-N	2,084	25,37	1,642	22,27
6. NH ₃ -N	0,816	9,91	0,789	10,67

Tabelle XV.

Auf 1 kg Organ umgerechnet	A mit Thymus		B mit Leber	
	N in g	% des N	N in g	% des N
1. Gesamt-N	8,568	—	8,512	—
2. Monoaminosäure-N	3,472	40,52	4,604	54,09
3. Albumosen-N	0,179	2,09	0,112	1,32
4. Purinbasen-N	1,870	21,87	0,302	3,55
5. Diaminosäure- + Pepton-N	2,149	25,08	2,596	30,49
6. NH ₃ -N	0,898	10,48	0,898	10,54

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß alle Zahlen in den Tabellen XIV und XV größer sind als in der Tabelle X mit Ausnahme der Zahl für die Albumosen. Das ist selbstverständlich, da die Spaltung des Eiweißmoleküls mit der Dauer zunimmt, dagegen zeigte sich auch bei der langdauernden Autolyse durchaus kein Unterschied zwischen Thymus und Leber hinsichtlich des Ammoniakgehaltes der Autolysenflüssigkeit.

Zum Vergleich der Natur der Enzyme wurde der Einfluß von Säuren und Alkalien, sowie der anderer Antiseptika untersucht.

Versuche über den Einfluß von Säure.

Die allgemeine Versuchsordnung ist wie bei den Leber-Versuchen.¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 51 (1912).

Tabelle XVI.

Nr. des Versuches	Kalbs-Thymus in g	Mit gesättigtem Chloroformwasser	N auf 1000 g Thymus umgerechnet	NH ₃ auf 1000 g Thymus umgerechnet	NH ₃ -N in % des Gesamt-N
I	30	291 ccm gesättigtes Chloroformwasser + 9 ccm Wasser	8,064	0,544	6,74
II	30	291 ccm gesättigtes Chloroformw. + 9 ccm n/2-H ₂ SO ₄	19,712	0,725	3,69
III	30	291 ccm gesättigtes Chloroformw. + 9 ccm n/2-H ₂ SO ₄	18,666	0,725	3,88

Aus den Versuchen mit Schwefelsäure geht hervor, daß Anwendung von Säure die Autolyse ebenso befördert, wie es bei der Autolyse der Leber der Fall ist; die Quantität des Ammoniaks steigt dementsprechend an, aber nicht proportional dem hohen N-Gehalt.

Versuch über den Einfluß von Alkali.

Die allgemeine Versuchsordnung ist wie beim Leber-Versuch.¹⁾

Tabelle XVII.

Nr. des Versuches	Kalbs-Thymus in g	Mit gesättigtem Chloroformwasser	N auf 1000 g Thymus umgerechnet	NH ₃ -N auf 1000 g Thymus umgerechnet	NH ₃ -N in % des Gesamt-N
I	30	285 ccm gesättigtes Chloroformwasser + 15 ccm H ₂ O	12,69	1,09	8,59
II	30	285 ccm gesättigtes Chloroformwasser + 9 ccm H ₂ O + 6 ccm 10% ige Na ₂ CO ₃ -Lösung	8,43	0,906	10,74
III	30	dieselbe Mischung	8,11	0,816	10,06
IV	30	285 ccm gesättigtes Chloroformwasser + 15 ccm 10% ige Na ₂ CO ₃ -Lösung	7,188	0,544	7,56
V	30	dieselbe Mischung	6,57	0,453	6,89

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 46 (1912).

Aus den Tabellen ergibt sich, daß Alkalien die Autolyse stören.

Die Autolyse mit $\frac{1}{32}$ 0/0iger Formaldehydlösung als Antiseptikum.

Die allgemeine Versuchsordnung ist wie beim Leber-Versuch.⁽³⁾

Es werden 2 Mischungen A und B angesetzt; beide enthalten 100 g fein gehackte Kalbsthymus mit $\frac{1}{32}$ 0/0iger Formaldehydlösung.

Digestionszeit im Thermostaten 70 Stunden.

Tabelle XVIII.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	A		B	
	N in g	% des N	N in g	% des N
1. Gesamt-N	6,776	—	7,0	—
2. Monoaminosäure-N	2,468	36,38	2,464	35,2
3. Albumosen-N	2,688	39,67	2,688	38,4
4. Purinbasen-N	0	0	0	0
5. Diaminosäure- + Pepton-N	1,216	17,94	1,386	19,79
6. NH ₃ -N	0,408	6,02	0,462	6,60

Bakteriologische Untersuchung negativ.

Höchst auffallend ist, daß bei der Autolyse mit Formaldehyd sich im Autolysat keine Purinbasen finden, die Nuclease also, wie es scheint, vollständig in ihrer Wirkung aufgehoben ist. Das Zinksulfat hat augenscheinlich auch die Nucleoproteide gefällt, daher die auffallend hohe Zahl für «Albumosen».

Die Autolyse mit überschüssigem Toluol¹⁾ als Antiseptikum.

Das Verfahren ist wie in vorigem Versuch.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 121 (1909).

Autolyse mit Toluol im Überschuß.

Tabelle XIX.

Auf 1 kg Thymus umgerechnet	N in g	% des N	N in g	% des N
1. Gesamt-N	7,504	—	7,448	—
2. Monoaminosäure-N	3,024	40,29	3,024	40,60
3. Albumosen-N	0,381	5,08	0,381	5,11
4. Purinbasen-N	1,758	20,36	1,725	23,15
5. Diaminosäure- + Pepton-N	1,593	21,22	1,604	21,54
6. NH ₃ -N	0,748	9,97	0,714	9,58

Es wurde nun noch ein Versuch genau so angestellt, wie Kutscher ihn ausgeführt hat, nur mußte aus Mangel an Zeit die Autolyse auf 14 Tage beschränkt werden, statt 23 Tage bei Kutscher.

500 g Thymus kleingehackt wurden mit Chloroformwasser aufgeschwemmt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann durch ein Koliertuch gegossen und mit den Händen abgepreßt. Die erhaltene trübe Flüssigkeit, deren Volumen nach Zusatz von Chloroformwasser 1 l betrug, wurde 14 Tage im Thermostaten digeriert, dann genau so verarbeitet, wie Kutscher es getan hat, auf dessen Arbeit, um Wiederholungen zu vermeiden, hier verwiesen werden muß.

Der Silberniederschlag ergab bei der Verarbeitung nur einen gelblichen Sirup, in dem sich vereinzelt krystallinische Ausscheidungen bemerkbar machten, deren Menge viel zu gering war, um sie weiter charakterisieren zu können. Thymin, das Kutscher mit Wahrscheinlichkeit gefunden hat, konnte also nicht festgestellt werden.

Aus dem Filtrat wurde schließlich in der Phosphorwolframsäurefällung eine kleine Quantität reiner, gut krystallisierter Verbindung erhalten, die augenscheinlich pikrinsaures Lysin darstellte. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Krystalle unter Erwärmen in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert, die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Äther entfernt, die wässrige Lösung wieder mit Phosphorwolframsäure gefällt

und stehen gelassen, der Niederschlag erwies sich bei der mikroskopischen Untersuchung als durchweg krystallinisch. Es handelte sich also wohl ohne Zweifel um Lysin.

Leucin konnte in dem Filtrat vor dem ersten Phosphorwolframsäureniederschlag nach Entfernung der Phosphorwolframsäure durch Baryt usw. in Übereinstimmung mit Kutscher nicht konstatiert werden. Es schien uns von Interesse, noch den beim Abkolieren der Thymus erhaltenen Rückstand zu untersuchen.

Zu dem Zweck wurde er 5 Tage lang der Autolyse mit Chloroformwasser unterworfen, dann koliert.

Das Filtrat wurde zur Entfernung von Eiweiß unter Zusatz von etwas Essigsäure zum Sieden erhitzt, filtriert und auf 500 ccm eingedampft.

Der N-Gehalt desselben, in 20 ccm bestimmt, ergab sich im ganzen zu 1,375 g, der NH_3 -N-Gehalt, in 40 ccm bestimmt (nach Krüger-Reich-Schittenhelm) zu 0,085 g, war also sehr gering.

Die Hauptmenge des Filtrates wurde zum dünnen Sirup eingedampft und einige Tage an einem kühlen Ort stehen gelassen. Es hatten sich Häute ausgeschieden, die nach der mikroskopischen Untersuchung leicht als Leucin festgestellt werden konnten, und bräunlich-weiße Körnchen. Die Masse wurde mit Wasser verdünnt und filtriert (A), der Filtrierrückstand abgespritzt und mehrmals durch Dekantieren gewaschen, dann im Kolben mit Wasser unter Zusatz von Ammoniak erhitzt, die heiß filtrierte Lösung auf dem Wasserbad bis zum Verschwinden des Ammoniaks eingedampft. Aus der erkalteten Lösung scheiden sich bald kreidige Massen aus, die durch die Millonsche Reaktion und sonstiges Verhalten leicht als Tyrosin identifiziert werden konnten.

Aus der vom Tyrosin abfiltrierten Lösung (A) schieden sich beim Eindampfen aufs neue Häute von Leucin aus, jedoch war die Quantität zur Reindarstellung zu gering. — Es wäre wünschenswert gewesen, mehrere Punkte noch weiter zu verfolgen, aus äußeren Gründen war mir dies aber nicht möglich.

Zusammenfassung.

1. Entgegen den Angaben von Kutscher, nach welchen bei der Selbstverdauung von den hydrolytischen Spaltungsprodukten des Eiweißes «eigentlich» nur zwei auftreten, nämlich Ammoniak und Lysin, wurde festgestellt, daß die Autolyse der Thymus in ihrem Wesen nicht von der der Leber abweicht, namentlich die Thymus nicht mehr Ammoniak liefert, als die Leber, nämlich rund 10% der gelösten Stickstoffsubstanz.

2. Abgesehen von dem übereinstimmenden Ammoniakgehalt der Autolysenflüssigkeit ist die Verteilung des Stickstoffs in quantitativer Beziehung abweichend: die Monaminsäuren und Albumosen betragen nur etwa halb so viel wie bei der Leber, dagegen die Gruppe Diaminosäuren + Pepton + Ammoniak etwa das Doppelte, die Purinbasen das Dreifache.

3. Von den Spaltungsprodukten des Eiweißes konnten Leucin und Tyrosin festgestellt werden, beide nur in geringen Mengen, Lysin mit großer Wahrscheinlichkeit.